

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03946

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12N15/12, C12P21/02, C12Q1/68, C07K16/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12N15/12, C12P21/02, C12Q1/68, C07K16/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), Genbank (GENETYX)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Sanpai, K. et al. "Identification of the spinocerebellar ataxia type 2 gene using a direct identification of repeat expansion and cloning technique, DIRECT" Nat. Genet. (1996, Nov.), Vol. 14, No. 3, p. 277-284	1 - 7
PX	Plust, S-M. et al. "Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2" Nat. Genet. (1996, Nov.), Vol. 14, No. 3, p. 269-276	1 - 7
PA	Imbert, G. et al. "Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamine repeats" Nat. Genet. (1996, Nov.), Vol. 14, No. 3, p. 285-291	1 - 7
A	Yvon, T. et al. "Polygutamine expansion as a pathological epitope in huntington's disease and four dominant cerebellar ataxias" Nature (1995), Vol. 378, p. 403-406	1 - 7

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search January 16, 1998 (16. 01. 98)	Date of mailing of the international search report January 27, 1998 (27. 01. 98)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03946

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Koide, R. et al. "Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA)" Nat. Genet. (1994), Vol. 6, p. 9-13	1 - 7
A	Li, S-H. et al. "Novel Triplet Repeat Containing Genes in Human Brain: Cloning, Expression, and Length Polymorphisms" Genomics (1993), Vol. 16, No. 3, p. 572-579	1 - 7

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局
特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 C12N 15/12, C12P 21/02, C12Q 1/68, C07K 16/18	A1	(11) 国際公開番号 WO98/18920 (43) 国際公開日 1998年5月7日(07.05.98)
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/03946 (22) 国際出願日 1997年10月30日(30.10.97) (30) 優先権データ 特願平8/304059 ✓ 1996年10月30日(30.10.96) JP (71) 出願人（米国を除くすべての指定国について） 株式会社 エスアールエル(SRL, INC.)[JP/JP] 〒190 東京都立川市曙町二丁目41番19号 Tokyo, (JP) (72) 発明者；および (75) 発明者／出願人（米国についてのみ） 辻 省次(TSUJI, Shoji)[JP/JP] 〒950-21 新潟県新潟市小針1-10-45 Niigata, (JP) 三瓶一弘(SANPEI, Kazuhiro)[JP/JP] 〒950 新潟県新潟市大島98-1 アドバンチージA-203 Niigata, (JP) (74) 代理人 弁理士 谷川英次郎(TANIGAWA, Hidejiro) 〒102 東京都千代田区飯田橋4丁目5番12号 岩田ビル6階 谷川国際特許事務所 Tokyo, (JP)	(81) 指定国 AU, CA, JP, US, 歐州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書	

(54)Title: cDNA FRAGMENTS OF GENE CAUSATIVE OF SPINOCEREBELLAR ATAXIA TYPE 2

(54)発明の名称 脊髄小脳変性症2型の原因遺伝子のcDNA断片

(57) Abstract

The cDNA fragments of a gene causative of spinocerebellar ataxia type 2 having a determined base sequence. These cDNA fragments contain nucleic acid regions encoding the amino acid sequences represented by SEQ ID NO:1 in the Sequence Listing, provided that the number of the repeating sequences of the 166th to 188th Gln varies within the range of from 15 to 100.

(57) 要約

塩基配列が決定された、脊髄小脳変性症2型の原因遺伝子のcDNA断片が開示されている。本発明のcDNA断片は、配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列（ただし、第166番目ないし第188番目のGlnの繰り返し数は15～100の間で変化する）をコードする核酸領域を含む。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード（参考情報）

A L	アルバニア	F I	フィンランド	L T	リトアニア	S N	セネガル
A M	アルメニア	F R	フランス	L U	ルクセンブルグ	S T	セワジランド
A T	オーストリア	G A	ガボン	L V	ラトヴィア	D G	チャード
A U	オーストラリア	G B	英国	M C	モナコ	T G	チーロー
A Z A	オゼルバイジャン	G E	グルジア	M D	モルドヴァ	J J	タジキスタン
B A	ボスニア・ヘルツェゴビナ	G H	ガーナ	M G	マダガスカル	T M	タルクメニスタン
B B	バルバドス	G M	ガニア	M K	マケドニア旧ユーゴス	R T	トルコ
B E	ベルギー	G N	ギニア	M K	マケドニア共和国	T T	トリニダッド・トバゴ
B F	ブルキナ・ファソ	G W	ギニア・ビサオ	M L	マリンガル	U A G	ウクライナ
B G	ブルガリア	G R	ギリシャ	M N	モンゴル	U U S	ウガンダ
B J	ベナン	H U	ハンガリー	M R	モーリタニア	Z N	米国
B R	ブラジル	H D	インドネシア	M W	マラウイ	U V	ウズベキスタン
B Y A	ペラルーシ	H E	アイルランド	M X	メキシコ	V N	ヴィエトナム
C A	カナダ	I L S	イスラエル	N E	ニジェール	Y	ヨーロースラヴィア
C F	中央アフリカ	I S T	アイスランド	N L	オランダ	Z W	ジンバブエ
C G G	コンゴ共和国	I T P	イタリア	N O	ノルウェー		
C H I	イスス	J P	日本	N P Z	ニュージーランド		
C I M	コートジボアール	K E G	ケニア	P L	ポーランド		
C M	カメルーン	K G P	キルギス	P P T	ポルトガル		
C N U	中国	K P	北朝鮮	R O U	ルーマニア		
C Y Z	キューバ	K R	韓国	R O U	ロシア		
C Z E	キプロス	K R C	カザフスタン	S D	スード		
D D E	チエツコ	L C	セントルシア	S E G	スウェーデン		
	ドイツ	L I	セリビテンシュタイン	S S G	シンガポール		

明細書

脊髄小脳変性症 2 型の原因遺伝子の cDNA 断片

技術分野

本発明は、脊髄小脳変性症 2 型（以下、「SCA 2」ということがある）の原因遺伝子の cDNA 断片、それがコードするタンパク質、該タンパク質に対する抗体及び前記 cDNA 断片のアンチセンス核酸に関する。

背景技術

SCA 2 は、小脳及び中枢神経系の他の領域に影響を与える、常染色体性優性神経変性症である。

最近、歯状核赤核・淡蒼球ルイ体委縮症 (dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA)) 等 6 種類の神経変性疾患において、原因遺伝子には CAG から成るトリプレットの反復数が正常な遺伝子よりも多く含まれていることが明らかになった。すなわち、これらの神経変性疾患患者の原因遺伝子では、CAG の反復数が 37 ~ 100 回であるのに対し、正常な遺伝子では 35 未満である。

SCA 2 についても、原因遺伝子では CAG の反復数が増大していることが示唆されている (Trottier, Y. et al. Nature, 378, 403-406 (1995))。しかしながら、SCA 2 の原因遺伝子は同定されておらず、その塩基配列も明らかではないので、SCA 2 を遺伝子検査により診断することはできない。

発明の開示

本発明の目的は、塩基配列が決定された、SCA 2 の原因遺伝子の cDNA 断片を提供することである。また、本発明の目的は、SCA 2 の治療や抗体調製のための免疫原として有用な、SCA 2 の原因遺伝子に基づいて産生されるタンパク質を提供することである。さらに、本発明の目的は、SCA 2 の治療や診断に有用な、該タンパク質に対する抗体を提供することである。さらに、本発明は、SCA 2 の治療に有用な、SCA 2 の原因遺伝子のアンチセンスを提供することである。

本願発明者らは、鋭意研究の結果、SCA 2 患者においてのみ CAG トリプレットの繰り返し数が増大している、2.5 kb の Tsp E1 断片を見出し、その部

分塩基配列を決定し、CAGトリプレットの繰り返しを挟む2つの領域にそれぞれハイブリダイズするオリゴヌクレオチドをプローブとして用いてヒトcDNAライブラリーをスクリーニングしてこれら2種類のプローブの両方とハイブリダイズするcDNA断片をクローニングし、さらにこのcDNA断片をプローブとして用いてヒトcDNAライブラリーをスクリーニングし、このプローブとハイブリダイズするcDNA断片を複数クローニングした。これらのcDNA断片の塩基配列を決定したところ、これらは互いに重複していた。5'末端側及び3'末端側の領域の塩基配列を決定するために、さらにRACE (rapid amplification of cDNA ends) を行ない、さらに5'側の端部の塩基配列を決定するためにRT-PCRを行ない、SCA2の原因遺伝子のcDNAの全領域の塩基配列を決定することに成功した。

すなわち、本発明は、配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列（ただし、第166番目ないし第188番目のGlnの繰り返し数は15～100の間で変化する）をコードする核酸領域を含む核酸断片を提供する。また、本発明は、上記本発明の核酸断片によりコードされるアミノ酸配列を有するタンパク質を提供する。さらに本発明は、該タンパク質と抗原抗体反応を行う抗体を提供する。さらに、本発明は、上記本発明の核酸断片から転写されるmRNAとハイブリダイズしてその翻訳を阻害する、15bp以上のサイズを有するアンチセンス核酸を提供する。

本発明により、塩基配列が決定された、SCA2の原因遺伝子のcDNA断片が提供された。本発明の核酸断片によりコードされるタンパク質はSCA2の治療に用いることができるし、また、SCA2の治療及び診断に有用な抗体を調製するための免疫原として用いることができる。さらに、本発明により、SCA2の原因遺伝子の塩基配列が明らかにされたので、該遺伝子に対するアンチセンスを設計することが可能になった。さらに、本発明により、上記本発明の核酸断片を、ヒト体内で所望の遺伝子を発現させることができる発現ベクターに組込んだ、ヒト体内で前記核酸断片を発現させることができる組換えベクター並びに該組換えベクターをヒトに導入し、ヒト体内で本発明の核酸断片を発現させる方法が提

供された。このように、本発明は S C A 2 の治療及び診断に大いに貢献するものと考えられる。

図面の簡単な説明

図 1 は、本発明の実施例において決定された、本発明の c D N A 断片の塩基配列をそれがコードするアミノ酸配列とともに示す図である。

図 2 は、図 1 の続きを示す図である。

図 3 は、図 2 の続きを示す図である。

図 4 は、図 3 の続きを示す図である。

図 5 は、本発明の実施例において材料として用いられた D N A が由来する S C A 2 患者の家系図である。

図 6 は、本発明の実施例において得られたゲノミック D N A 断片 Tsp1 及び Ts p2 並びに S C A 2 c D N A のサイズ、位置及び制限酵素部位並びに得られた各 c D N A 断片のサイズ及び位置を示す図である。

図 7 は、(CAG)₅₅ プローブを用いて測定された、正常遺伝子及び S C A 2 遺伝子中の C A G 反復単位の数の分布を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

上記のように、本発明の核酸断片は、配列表の配列番号 1 に示されるアミノ酸配列をコードする核酸領域を含む。ただし、第 166 番目ないし第 188 番目の Gln の繰り返し数は 15 ~ 100 の間で変化する。なお、この繰り返し数は、健常人では 15 ~ 25 個であり、一方、 S C A 2 患者では 35 ~ 100 個である。なお、周知のように、縮重により 1 つのアミノ酸をコードするコドンは複数存在するが、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列をコードするものであれば、いずれの塩基配列を有するものであっても本発明の範囲に含まれる。なお、下記実施例において実際に決定された塩基配列は配列番号 1 及び図 1 ~ 4 に示される。この塩基配列がどのようにして決定されたか、また、この塩基配列を有する c D N A が S C A 2 の原因遺伝子の c D N A であることは下記実施例に詳述されている。

本発明の核酸断片は、下記実施例に詳述する方法によりクローニングすることができる。また、本発明の核酸断片は、本発明によりその塩基配列が決定された

ので、ヒトcDNAライブラリーを鑄型として用いたPCRによる増幅や、さらにそのPCR産物をプローブとしたハイブリダイゼーションにより、クローニングすることができる。なお、単一のPCRで増幅することが困難な場合には、複数の領域に分け、増幅産物を常法により連結してクローニングすることもできる。

5 上記本発明の核酸断片を、常法により、市販の発現ベクターのマルチクローニング部位に組込み、得られた組換えベクターで宿主細胞を形質転換することにより、該核酸断片によりコードされるタンパク質を発現させることができる。任意の遺伝子を宿主細胞内で発現させるための宿主一ベクター系は、この分野において周知であり、多くの宿主一ベクター系が市販されている。このような市販の宿
10 主一ベクター系を用いて当業者は容易に本発明の核酸断片を発現させてタンパク質を生産することができる。このような周知の方法は例えば、D. M. Glover, DN
A Cloning Volume III a practical approach, 1987, IRL Pressに記載されて
15 いる。

例えば、本発明の核酸断片を、定法に従い、プライマーに制限酵素部位を導入したロングPCR (LA PCR) (向井博之 蛋白質核酸酵素 Vol41, No. 5, 585-594, 1
996) を用いて増幅させ、増幅産物を制限酵素処理し、これを市販のプラスミド
ベクターである pGEX (ファルマシア社製) のマルチクローニング部位に挿入し
てライゲーションし、得られた組換えベクターで大腸菌DH5 α 株 (GIBCO BRL
社製) を常法である塩化カルシウム法により形質転換し、薬剤耐性マーカー (ア
20 シピシリジン耐性) の形質転換株を選択し、該形質転換株からSCA2の原因遺伝
子がコードするタンパク質を回収することができる。またこのベクターを用いる
と目的蛋白質は、GST (Glutathion S-Transferase) との融合蛋白質として発現
するので、市販の抗GST抗体 (ファルマシア社製) を用いて容易に検出する事が
25 できる。

健常人の遺伝子 (CAGリピートが15~25回) に基づいて產生されたタン
パク質で活性を持つものは、正常な機能を有していると考えられるので、これを
SCA2患者に投与することによりSCA2を治療し又はその症状を軽減させ
ことができる。ただしSCA2の遺伝形式は、常染色体優性遺伝であるので、後

述するアンチセンスにより、患者由来の SCA 2 原因遺伝子を同時にブロックする必要がある。

上記本発明のタンパク質又は免疫原性を有するその一部を免疫原として用いて動物を免疫し、該動物から常法により該タンパク質又はその部分に対する抗体を回収することができる。抗体はポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよく、モノクローナル抗体も周知の方法により調製できる。

また CAG リピートによってコードされるポリグルタミン鎖を用いて、その長さの違いのみによって反応性の異なる抗体を作製することは論理的に困難であるが、本発明で明らかになった、蛋白質の全長を用いることにより、健常人と患者の蛋白質の違いを立体構造の違いとして認識する抗体をつくることができる。さらに本発明により、SCA2 遺伝子産物で、健常人と患者に共通な部分を用いて抗体を作製することができるので、本発明蛋白質に対する抗体を用いた、あらゆる検出系において対照が可能となる。これらの抗体を用いて、定法により、例えばプレート法のような簡便な検出法を作ることができる。

また、本発明の抗体を、周知の方法によりアガロースゲル（例えばファルマシア社のセファデックス（商品名）等）やポリスチレンビーズ等に常法により不動化し、カラムに詰めてアフィニティカラムを作製することができる。このアフィニティカラムに患者の体液（血液、血清、髄液等）を通すことにより、患者の SCA 2 原因遺伝子由来タンパク質を取得することができ、これを溶離してその分子量を測定することにより、SCA 2 の診断を行うことができる。なぜなら SCA 2 患者の当該タンパク質は健常人のものよりも、CAG リピートが多いだけ分子量が大きいからである。

また遺伝子治療としては、異常 SCA2 産物の産生停止と正常 SCA2 産物の導入の 2 通りが考えられ、前者の方法としては、アンチセンスを使った、mRNA の翻訳のブロック、後者の方法としては、前述のような、インビトロで得られた SCA 2 遺伝子産物の投与や当該核酸断片の細胞内への導入がある。CAG リピートの伸長による SCA 2 患者においては、異常タンパク質が優性に作用すると考えられていることから、両者を同時に用うことで効果が得られる予想されるが、該

核酸断片の導入の場合はアンチセンスを SCA 2 産物の活性に関与しない部分に設定し、導入される正常 SCA 2 遺伝子からはその部分を取り除き、互いに効果を相殺させないようにする。またそのようにアンチセンスと正常 SCA 2 遺伝子を設定することにより、上記アンチセンスと SCA 2 遺伝子を同一ベクター内に組込んで細胞内へ導入することも可能である。

5

10

15

本発明のアンチセンス核酸は、本発明の核酸断片から転写される mRNA とハイブリダイズしてその翻訳を阻害するものであり、少なくとも 15 bp のサイズを有する。アンチセンスのサイズは 15 bp 以上、核酸断片のコード領域の全長以下のサイズを有することが好ましく、より好ましくは 50 bp 以上、コード領域の全長以下である。アンチセンス核酸は、本発明の核酸断片から転写される mRNA の全部又は一部と完全に相補的な塩基配列を有していることが好ましいが、生体内でハイブリダイズできるだけの相同性を有しているものも本発明の範囲内に含まれる。本発明のアンチセンスを SCA 2 患者に投与することにより、患者の SCA 2 原因遺伝子をブロックすることができ、そうした上で健常人由来の上記タンパク質を投与することにより SCA 2 の治療又は症状の軽減を達成することができる。アンチセンス核酸の投与量は、患者の状態により適宜選択されるが、通常体重 1 kg、1 日当たり本発明のアンチセンス核酸を 0.001 mmol ~ 1000 mmol 程度投与する。

20

25

遺伝子を生体内に導入する主な手段として、レトロウイルスやアデノウイルスをベクターとして用いる方法（瀬戸口靖弘、実験医学 Vol. 12 No. 15 (増刊) 1994, pp. 114-121; 鐘ヶ江裕美ら、実験医学 Vol. 12 No. 15 (増刊) 1994, pp. 34-40）、リポソームによる方法、あるいはそれらを融合したもの（膜融合リポソーム等）が知られている。そのうちのアデノウイルスは、標的細胞の分裂増殖なしで導入遺伝子を発現させるため、当該核酸を神経系へ導入する手段としてもっとも適当である。具体的には野生株アデノウイルス 5 型 DNA の E1a の一部と E3 を取り除き、二本鎖 DNA とした当該核酸をプロモーター等の発現ユニットと共に組み込み、E1a、E1b 遺伝子を発現するヒト胎児腎由来の 293 細胞で増殖させ、ウイルス液を調整して接種する。細胞核内に取り込まれたウイルスゲノムは複製すること

なく染色体外にあり、神経細胞では細胞分裂によってウイルスゲノムが失われないのでも、1~3ヶ月間は、正常SCA2遺伝子の発現を持続させることができる。

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

5 実施例 1

(1) (CAG)₅₅ プローブの調製

C A G 反覆単位を 50 個含む歯状核赤核・淡蒼球ルイ体委縮症 (dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA)) 遺伝子 (Koide, R. et al., Nature Genet., 6, 9-13 (1994)) を DRPLA 患者のゲノミック DNA から増幅し、プラスミドベクター pT7Blue T (p-2093) にサブクローニングした。p-2093 は、(CAG)₅₅ 及びその両端のフランкиング配列を含む。すなわち、5'-CAC CAC CAG CAA CAG C AA (CAG)₅₅ CAT CAC GGA AAC TCT GGG CC-3' で表される配列を含む。一対のオリゴヌクレオチドプライマー、すなわち、5'-CAC CAC CAG CAA CAG CAA CA-3' 及び 5'-ビオチン-GGC CCA GAG TTT CCG TGA TG-3' を用いて PCRを行なった。PCR は、10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 2M N,N,N,N-トリメチルグリシン、0.1 mM TTP, 0.1 mM dCTP, 0.1 mM dGTP, 9.25 MBq の [α-³²P]dATP (222 TBq/mmol), 0.5 μM ずつの各プライマー、0.3 ng のプラスミド DNA (p-2093) 及び 2.0 U の Taq DNA ポリメラーゼ (日本国京都府の宝酒造社製) を含む全量 16 μl の溶液を用いて行った。最初に 94 °C で 2 分間変性を行つた後、94 °C、1 分の変性、54 °C、1 分のアニーリング、72 °C、3 分の伸長を 30 サイクル行い、最後に 72 °C で 10 分間伸長を行つた。

20 μl のストレプトアビジンを被覆した磁化ビーズ (Dynabeads M-280, Streptavidin; ノルウェー、Dynal AS 社製) を用いて一本鎖(CAG)₅₅ プローブを調製した。すなわち、PCR 産物をストレプトアビジン被覆磁化ビーズに吸着させた後、5 mM Tris-HCl (pH7.5)、0.5 mM EDTA 及び 1 M NaCl を含む 40 μl の溶液でビーズを洗浄した。次いで 50 μl の 0.1 M NaOH 溶液中で 10 分間インキュベートすることにより、放射標識された非ビオチン化鎖をビオチン化鎖から分離した。得られた上清をプローブ液としてそのまま下記ハイ

ブリダイゼーションに用いた。

なお、上記のようにして調製した一本鎖(CAG)₅₅ プローブを用いて、CAG反復単位数が9、22、43、51であるアンドロゲンレセプター遺伝子についてサザン分析を行ったところ、(CAG)₅₅ プローブはCAG反復単位が43及び51個の遺伝子とは強くハイブリダイズしたが、22個の遺伝子とはほとんどハイブリダイズせず、9個の遺伝子とは全くハイブリダイズしなかった(K. Sanpei et al., Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 212, No. 2, 1995, pp. 341-346)。すなわち、このプローブを用いれば、ハイブリダイゼーション条件を適正に設定することにより、CAG反復単位を多数（例えば35個以上）含むDNAとのみ特異的にハイブリダイズさせることが可能である。

(2) SCA2遺伝子の塩基配列決定

図5には、SCA2患者の家系図を示す。この家系図において、男性が四角、女性が丸で示されており、患者は黒く塗りつぶされており、健常人は白抜きで示されている。

これらのSCA2患者及び健常人から常法により採取した高分子量ゲノミックDNA（各15μg）を100UのTspEI（日本国大阪府の東洋紡績社製）で消化し、0.8%アガロースゲル電気泳動にかけ、ニトロセルロース膜に転写した。次いで、該膜を上記(CAG)₅₅ プローブとハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーションは、2.75×SSPE (1×SSPE = 150 mM NaCl, 10 mM NaH₂PO₄, 1 mM EDTA), 50% ホルムアミド、5×デンハルツ液、100 ng/ml 剪断サケ精子DNA及び(CAG)₅₅ プローブ (6 × 10⁶ cpm/ml) を含む溶液中で62°Cで18時間行った。ハイブリダイゼーション後、0.5% SDSを含む1×SSC (150 mM NaCl, 15 mM クエン酸ナトリウム) で膜を65°Cで0.5時間洗浄した。次いで、MS増感スクリーンを用い、Kodak Bio Max MS フィルムに16時間-70°Cでオートラジオグラフィーにかけた。

その結果、全てのSCA2患者についてのみ、プローブとハイブリダイズした2.5 kbp のTspEI 断片が検出された。

そこで、一人のSCA2患者（図5中の7）からゲノミックDNAを常法によ

り抽出し、その $270\mu g$ をTspE1で消化し、アガロースゲル電気泳動にかけた。上記した2.5 kbのTspE1断片を包含するゲノミックDNA断片を、EcoRIで開裂したλ ZAPII（Stratagene社製）ベクターにクローニングした。得られたゲノミックライブラリーを上記(CAG)₅₅プローブを用い、上述したハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズさせることによりスクリーニングした。増大したCAG反復を含むゲノミッククローンTsp1が単離された。

プローブを除去した後、ランダムプライム法により標識したTsp1をプローブとして用いて上記ゲノミックライブラリーを再度スクリーニングした。ハイブリダイゼーションは5×SSC、1×デンハルツ液、10%硫酸デキストラン、20 mMリン酸ナトリウム、 $400\mu g/ml$ のヒト胎盤DNA及びTsp1プローブを含む溶液中で42°Cで18時間行った。ハイブリダイゼーション後、膜を最終的に0.1×SSC-0.1% SDS中で52°Cで0.5時間洗浄した。MS増感スクリーンを用い、膜をKodak Bio Max MSフィルムに-70°Cで24時間オートラジオグラフィにかけた。その結果、正常な対立遺伝子由来のゲノミッククローンであるTsp2が単離された。

また、Tsp2のSmaI-ApaI断片(630 bp)の塩基配列を決定し、CAG反復領域を挟むようにオリゴヌクレオチドF-1(5'-CCC TCA CCA TGT CGC TGA AGC-3')及びR-1(5'-CGA CGC TAG AAG GCC GCT G-3')を設定した(図1参照)。ヒト前脳皮質cDNAライブラリー(Stratagene社製)をオリゴヌクレオチドF-1及びR-1をプローブとして用いてスクリーニングした。ハイブリダイゼーションは、6×SSC、10×デンハルツ液、0.5% SDS、0.05%ピロリン酸ナトリウム、100 ng/ml剪断サケ精子DNA及び末端標識オリゴヌクレオチドプローブを含む溶液中で55°Cで18時間行った。ハイブリダイゼーション後、膜を最終的に0.5% SDS及び0.05%ピロリン酸ナトリウムを含む6×SSC中で55°Cで0.5時間洗浄した。両方のプローブとハイブリダイズする、4.0 kbのcDNAクローンFc1が得られた。Fc1、Tsp1及びTsp2の塩基配列を決定し、比較したところ、CAG反復領域近傍の塩基配列は、CAGの反復回数を除き一致していた。なお、Tsp1及びTsp2の制限酵素地図並びにFc1及び後述の他の断片のサイズ及

び位置を図6に示す。さらに、Fc1 又は以降のスクリーニングにより単離された断片をプローブとして用いて種々のヒトcDNAライブラリー（ヒト前脳皮質、ヒト胎児脳、ヒト脳及びヒト脳幹）をスクリーニングすることにより、cDNAクローンFc2、Fb14、B4、C6 及び C19 を単離した（図6参照）。Fc1 の5'末端を同定するために、5'-RACE-Ready cDNA (Clonetech, Palo Alto, CA, USA) を用いて 5'-RACE を行った (Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8998-9002 (1988))。プライマーR-1を第1のPCRに用い、プライマ一R-2 (5'-CTT GCG GAC ATT GGC AGC C-3'、図1参照) を第2のPCRに用いた。なお、forward 側のプライマーとしてはいずれの場合も F-1 (図1参照) を用いた。350 bp の 5'-RACE 産物 (5R1) を pT7Blue T ベクターにサブクローニングした (pT7Blue T-vector(5R1))。5R1 の同一性は、Fc1, Tsp1 及び Tsp2 の塩基配列とのオーバーラップにより確認した。cDNAの3'末端を同定するために、ヒト脳から抽出された poly(A)⁺mRNA の 1 μg を鑄型として用い、プライマーF-1 3 (5'-TTC TCT CAG CCA AAG CCT TCT ACT ACC-3'、図3参照) をプライマーとして用いて 3'-RACE を行なった。得られた 1300 bp の 3'-RACE 産物 (3R1) を pT7Blue T ベクターにサブクローニングした (pT7Blue T-vector(3R1))。

cDNAの5'領域をさらに調べるために、逆転写PCR (RT-PCR) を行なつた。すなわち、ヒト脳からのオートプシーから抽出された全RNAを先ず、RNase フリーの DNase (Promega 社製) で消化した (Onodera, O. et al., Am. J. Hum. Genet. 57, 1050-1060 (1995))。逆転写反応は、2 μg の全RNAと、2.0 pmol のランダムヘキサマーを用い、42°Cで行なった (Onodera, O. et al., 前掲)。PCRのプライマーとしては、F1006 (5'-TAT CCG CAG CTC CGC TCC C-3'、図1参照) 及び R1002 (5'-AGC CGG GCC GAA ACG CGC CG-3'、図1参照) を用いた。5 pmol ずつの各プライマー、10 mM Tris HCl (pH8.3)、50 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、1.7M N,N,N,N-トリメチルグリシン、200 μM ずつの dATP, dCTP 及び TTP、100 μM の dGTP、100 μM の 7-デアザ dGTP 及び 2.5 U の Taq ポリメラーゼ (宝酒造社製) を含む総量 20 μl の溶液中で PCRを行なった。96

°Cで2分間初期変性を行なった後、96°C1分間の変性工程、65°C1分間のアニーリング工程、72°C1分間の伸長工程から成るサイクルを30回繰り返し、最後に72°Cで5分間伸長することによりPCRを行なった。その結果、5R1の上流に246 bp延びる、クローン5R1を得た(図6参照)。

5 なお、図6中、Tsp1及びTsp2断片中の白抜きの部分はSCA2cDNA中に存在する領域を示す。また、SCA2cDNA中の白抜きの部分はコード領域を示す。CAG反復領域の位置は黒塗りのボックスで示されている。TspE1(T)、NotI(N)、SacII(S)、Sau3AI(Sa)、SmaI(Sm)、Eco52I(E52)、ApaI(Ap)、AccI(Ac)、BamHI(B)、XhoI(X)、EcoRI(E)及びPstI(P)の制限酵素部位が示されている。各cDNAクローンのサイズ及び位置がコンセンサスSCA2cDNAの下に示されている。

10 本実施例においては、二本鎖プラスミドDNAを鑄型として用いたジデオキシヌクレオチドチェーンターミネーション法(Sanger, F. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467(1977); Chen E.Y. et al, DNA 4, 165-170 (1985))によりDNAの二本鎖の塩基配列を決定した。CAG反復領域及びその隣接領域の塩基配列を決定するために、ビオチン化したF-1及びRS-1(5'-CCT CGG TGT CGC GGC GAC TTC C-3')を用いたPCRにより、CAG反復領域を含むゲノミック断片を増幅した。0.25 μMずつの各プライマー、10 mM Tris HCl(pH8.3)、50 mM KCl、2.0 mM MgCl₂、1.7M N,N,N,N-トリメチルグリシン、200 μMずつのdNTP、200 ngのゲノミックDNA、及び1.25 UのTaqポリメラーゼ(宝酒造社製)を含む総量25 μlの溶液中でPCRを行なった。95°Cで2分間初期変性を行なった後、95°C1分間の変性工程、62°C1分間のアニーリング工程、72°C1分間の伸長工程から成るサイクルを32回繰り返し、最後に72°Cで5分間伸長することによりPCRを行なった。ストレプトアビシン被覆磁石ビーズを用いてビオチン化された鎖を回収し、直接塩基配列分析を行なった。

20 上記各cDNAクローンの塩基配列に基づき、ポリアテールを除いて4351 bpのコンセンサスSCA2cDNA配列を決定した(配列番号1及び図1~4、図6参照)。なお、配列番号1の4352 nt~4367 ntはポリアテールを

示すものであり、Aの数は必ずしも配列番号1に記載のものに限らない。なお、独立したcDNAクローンであるC19、B4及び3R1において、同一の位置にポリAテールが存在することが確認された。

実施例2 検体中のCAG反復単位数の測定

5 プライマーF-1及びR-1を用いて得られたPCR産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけることにより、CAG反復単位の数を測定した。PCRは、
10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 2.0 mM MgCl₂, 1.7 M N,N,N,N-トリメチル
グリシン、111KBqの[α-³²P]dCTP (111 Tbp/mmol), 30 μM dCTP, 各 200 μ
MのdATP, dGTP 及び TTP, 各 0.25 μMの上記2種類のプライマー、200 ng の
10 ゲノミックDNA並びに1.25 UのTaq DNA ポリメラーゼを含む全量10 μlの
溶液中で行った。まず、95°C、2分間変性を行った後、95°C、1分間の変性、
60°C、1分間のアニーリング及び72°C、1分間の伸長からなるサイクルを3
2回繰り返し、最後に72°C、5分間の伸長を行った。SCA2遺伝子のクロー
ン化されたゲノミック領域を用いて得られた、種々のサイズのCAG反復単位を
15 含む配列ラダー (sequence ladder)をサイズマーカーとして用いた。CAG反復
領域中にCAAを含む正常な対立遺伝子の場合には、これらのCAA単位はCA
領域に含まれた。CAG領域が増大しているSCA2対立遺伝子の場合、
CAA領域直後の上記挿入配列はCAG領域のサイズには含まれなかつた。

20 上記の方法により、健常人 (286染色体) 及び10家系のSCA2患者 (3
4種のSCA2染色体) におけるCAG反復単位数を測定した。結果を図7に示
す。図7中、白抜きの棒グラフが正常遺伝子についての結果を示し、黒塗りの棒
グラフがSCA2遺伝子についての結果を示す。

25 図7から明らかなように、正常遺伝子ではCAG反復単位の数が全て24個以
下であるのに対し、SCA2遺伝子では全て35個以上であった。よって、上記
により特定されたcDNAは、SCA2の原因遺伝子のcDNAであることが確
認された。

配列表

配列番号：1

配列の長さ：4367

配列の型：核酸

5 鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

TATCCGCACC TCCGCTCCCA CCCGGCGCCT CGGCCGCCGCC GCCCTCCG ATG CGC TCA 57

Met Arg Ser

10

1

GCG GCC GCA GCT CCT CGG AGT CCC GCG GTG GCC ACC GAG TCT CGC CGC 105

Ala Ala Ala Ala Pro Arg Ser Pro Ala Val Ala Thr Glu Ser Arg Arg

5 10 15

TTC GCC GCA GCC AGG TGG CCC GGG TGG CGC TCG CTC CAG CGG CCG GCG 153

15 Phe Ala Ala Ala Arg Trp Pro Gly Trp Arg Ser Leu Gln Arg Pro Ala

20 25 30

35

CGG CGG AGC GGG CGG GGC GGC GGT GGC GCG GCC CCG GGA CCG TAT CCC 201

Arg Arg Ser Gly Arg Gly Gly Gly Ala Ala Pro Gly Pro Tyr Pro

40 45 50

20 TCC GCC GCC CCT CCC CCG CCC GGC CCC GGC CCC CCT CCC TCC CGG CAG 249

Ser Ala Ala Pro Pro Pro Pro Gly Pro Gly Pro Pro Ser Arg Gln

55 60 65

AGC TCG CCT CCC TCC GCC TCA GAC TGT TTT GGT AGC AAC GGC AAC GGC 297

Ser Ser Pro Pro Ser Ala Ser Asp Cys Phe Gly Ser Asn Gly Asn Gly

25 70 75 80

GGC GGC GCG TTT CGG CCC GGC TCC CGG CGG CTC CTT GGT CTC GGC GGG 345

Gly Gly Ala Phe Arg Pro Gly Ser Arg Arg Leu Leu Gly Leu Gly Gly

85 90 95

CCT CCC CGC CCC TTC GTC GTC CTT CTC CCC CTC GCC AGC CCG GGC 393
Pro Pro Arg Pro Phe Val Val Val Leu Leu Pro Leu Ala Ser Pro Gly
100 105 110 115
GCC CCT CCG GCC GCG CCA ACC CGC GCC TCC CCG CTC GGC GCC CGT GCG 441
5 Ala Pro Pro Ala Ala Pro Thr Arg Ala Ser Pro Leu Gly Ala Arg Ala
120 125 130
TCC CCG CCG CGT TCC GGC GTC TCC TTG GCG CGC CCG GCT CCC GGC TGT 489
Ser Pro Pro Arg Ser Gly Val Ser Leu Ala Arg Pro Ala Pro Gly Cys
135 140 145
10 CCC CGC CCG GCG TGC GAG CCG GTG TAT GGG CCC CTC ACC ATG TCG CTG 537
Pro Arg Pro Ala Cys Glu Pro Val Tyr Gly Pro Leu Thr Met Ser Leu
150 155 160
AAG CCC CAG CAA 585
Lys Pro Gln
15 165 170 175
CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CCG CCG CCC GCG GCT GCC AAT 633
Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Pro Pro Pro Ala Ala Ala Asn
180 185 190 195
GTC CGC AAG CCC GGC GGC AGC GGC CTT CTA GCG TCG CCC GCC GCG GCG 681
20 Val Arg Lys Pro Gly Gly Ser Gly Leu Leu Ala Ser Pro Ala Ala Ala
200 205 210
CCT TCG CCG TCC TCG TCC TCG GTC TCC TCG TCC TCG GCC ACG GCT CCC 729
Pro Ser Pro Ser Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Ala Thr Ala Pro
215 220 225
25 TCC TCG GTG GTC GCG GCG ACC TCC GGC GGC GGG AGG CCC GGC CTG GGC 777
Ser Ser Val Val Ala Ala Thr Ser Gly Gly Arg Pro Gly Leu Gly
230 235 240
AGA GGT CGA AAC AGT AAC AAA GGA CTG CCT CAG TCT ACG ATT TCT TTT 825

Arg Gly Arg Asn Ser Asn Lys Gly Leu Pro Gln Ser Thr Ile Ser Phe
 245 250 255
 GAT GGA ATC TAT GCA AAT ATG AGG ATG GTT CAT ATA CTT ACA TCA GTT 873
 Asp Gly Ile Tyr Ala Asn Met Arg Met Val His Ile Leu Thr Ser Val
 5 260 265 270 275
 GTT GGC TCC AAA TGT GAA GTA CAA GTG AAA AAT GGA GGT ATA TAT GAA 921
 Val Gly Ser Lys Cys Glu Val Gln Val Lys Asn Gly Gly Ile Tyr Glu
 280 285 290
 GGA GTT TTT AAA ACT TAC AGT CCG AAG TGT GAT TTG GTA CTT GAT GCC 969
 10 Gly Val Phe Lys Thr Tyr Ser Pro Lys Cys Asp Leu Val Leu Asp Ala
 295 300 305
 GCA CAT GAG AAA AGT ACA GAA TCC AGT TCG GGG CCG AAA CGT GAA GAA 1017
 Ala His Glu Lys Ser Thr Glu Ser Ser Ser Gly Pro Lys Arg Glu Glu
 310 315 320
 15 ATA ATG GAG AGT ATT TTG TTC AAA TGT TCA GAC TTT GTT GTG GTA CAG 1065
 Ile Met Glu Ser Ile Leu Phe Lys Cys Ser Asp Phe Val Val Val Gln
 325 330 335
 TTT AAA GAT ATG GAC TCC AGT TAT GCA AAA AGA GAT GCT TTT ACT GAC 1113
 Phe Lys Asp Met Asp Ser Ser Tyr Ala Lys Arg Asp Ala Phe Thr Asp
 20 340 345 350 355
 TCT GCT ATC AGT GCT AAA GTG AAT GGC GAA CAC AAA GAG AAG GAC CTG 1161
 Ser Ala Ile Ser Ala Lys Val Asn Gly Glu His Lys Glu Lys Asp Leu
 360 365 370
 GAG CCC TGG GAT GCA GGT GAA CTC ACA GCC AAT GAG GAA CTT GAG GCT 1209
 25 Glu Pro Trp Asp Ala Gly Glu Leu Thr Ala Asn Glu Glu Leu Glu Ala
 375 380 385
 TTG GAA AAT GAC GTA TCT AAT GGA TGG GAT CCC AAT GAT ATG TTT CGA 1257
 Leu Glu Asn Asp Val Ser Asn Gly Trp Asp Pro Asn Asp Met Phe Arg

	390	395	400	
	TAT AAT GAA GAA AAT TAT GGT GTA GTG TCT ACG TAT GAT AGC AGT TTA			1305
	Tyr Asn Glu Glu Asn Tyr Gly Val Val Ser Thr Tyr Asp Ser Ser Leu			
	405	410	415	
5	TCT TCG TAT ACA GTG CCC TTA GAA AGA GAT AAC TCA GAA GAA TTT TTA			1353
	Ser Ser Tyr Thr Val Pro Leu Glu Arg Asp Asn Ser Glu Glu Phe Leu			
	420	425	430	435
	AAA CGG GAA GCA AGG GCA AAC CAG TTA GCA GAA GAA ATT GAG TCA AGT			1401
	Lys Arg Glu Ala Arg Ala Asn Gln Leu Ala Glu Glu Ile Glu Ser Ser			
10	440	445	450	
	GCC CAG TAC AAA GCT CGA GTG GCC CTG GAA AAC GAT GAT AGG AGT GAG			1449
	Ala Gln Tyr Lys Ala Arg Val Ala Leu Glu Asn Asp Asp Arg Ser Glu			
	455	460	465	
	GAA GAA AAA TAC ACA GCA GTT CAG AGA AAT TCC AGT GAA CGT GAG GGG			1497
15	Glu Glu Lys Tyr Thr Ala Val Gln Arg Asn Ser Ser Glu Arg Glu Gly			
	470	475	480	
	CAC AGC ATA AAC ACT AGG GAA AAT AAA TAT ATT CCT CCT GGA CAA AGA			1545
	His Ser Ile Asn Thr Arg Glu Asn Lys Tyr Ile Pro Pro Gly Gln Arg			
	485	490	495	
20	AAT AGA GAA GTC ATA TCC TGG GGA AGT GGG AGA CAG AAT TCA CCG CGT			1593
	Asn Arg Glu Val Ile Ser Trp Gly Ser Gly Arg Gln Asn Ser Pro Arg			
	500	505	510	515
	ATG GGC CAG CCT GGA TCG GGC TCC ATG CCA TCA AGA TCC ACT TCT CAC			1641
	Met Gly Gln Pro Gly Ser Gly Ser Met Pro Ser Arg Ser Thr Ser His			
25	520	525	530	
	ACT TCA GAT TTC AAC CCG AAT TCT GGT TCA GAC CAA AGA GTA GTT AAT			1689
	Thr Ser Asp Phe Asn Pro Asn Ser Gly Ser Asp Gln Arg Val Val Asn			
	535	540	545	

GGA GGT GTT CCC TGG CCA TCG CCT TGC CCA TCT CCT TCC TCT CGC CCA 1737
 Gly Gly Val Pro Trp Pro Ser Pro Cys Pro Ser Pro Ser Ser Arg Pro
 550 555 560
 CCT TCT CGC TAC CAG TCA GGT CCC AAC TCT CTT CCA CCT CGG GCA GCC 1785
 5 Pro Ser Arg Tyr Gln Ser Gly Pro Asn Ser Leu Pro Pro Arg Ala Ala
 565 570 575
 ACC CCT ACA CGG CCG CCC TCC AGG CCC CCC TCG CGG CCA TCC AGA CCC 1833
 Thr Pro Thr Arg Pro Pro Ser Arg Pro Pro Ser Arg Pro Ser Arg Pro
 580 585 590 595
 10 CCG TCT CAC CCC TCT GCT CAT GGT TCT CCA GCT CCT GTC TCT ACT ATG 1881
 Pro Ser His Pro Ser Ala His Gly Ser Pro Ala Pro Val Ser Thr Met
 600 605 610
 CCT AAA CGC ATG TCT TCA GAA GGG CCT CCA AGG ATG TCC CCA AAG GCC 1929
 Pro Lys Arg Met Ser Ser Glu Gly Pro Pro Arg Met Ser Pro Lys Ala
 15 615 620 625
 CAG CGA CAT CCT CGA AAT CAC AGA GTT TCT GCT GGG AGG GGT TCC ATA 1977
 Gln Arg His Pro Arg Asn His Arg Val Ser Ala Gly Arg Gly Ser Ile
 630 635 640
 TCC AGT GGC CTA GAA TTT GTA TCC CAC AAC CCA CCC AGT GAA GCA GCT 2025
 20 Ser Ser Gly Leu Glu Phe Val Ser His Asn Pro Pro Ser Glu Ala Ala
 645 650 655
 ACT CCT CCA GTA GCA AGG ACC AGT CCC TCG GGG GGA ACG TGG TCA TCA 2073
 Thr Pro Pro Val Ala Arg Thr Ser Pro Ser Gly Gly Thr Trp Ser Ser
 660 665 670 675
 25 GTG GTC AGT GGG GTT CCA AGA TTA TCC CCT AAA ACT CAT AGA CCC AGG 2121
 Val Val Ser Gly Val Pro Arg Leu Ser Pro Lys Thr His Arg Pro Arg
 680 685 690
 TCT CCC AGA CAG AAC AGT ATT GGA AAT ACC CCC AGT GGG CCA GTT CTT 2169

Ser Pro Arg Gln Asn Ser Ile Gly Asn Thr Pro Ser Gly Pro Val Leu
 695 700 705
 GCT TCT CCC CAA GCT GGT ATT ATT CCA ACT GAA GCT GTT GCC ATG CCT 2217
 Ala Ser Pro Gln Ala Gly Ile Ile Pro Thr Glu Ala Val Ala Met Pro
 5 710 715 720
 ATT CCA GCT GCA TCT CCT ACG CCT GCT AGT CCT GCA TCG AAC AGA GCT 2265
 Ile Pro Ala Ala Ser Pro Thr Pro Ala Ser Pro Ala Ser Asn Arg Ala
 725 730 735
 GTT ACC CCT TCT AGT GAG GCT AAA GAT TCC AGG CTT CAA GAT CAG AGG 2313
 10 Val Thr Pro Ser Ser Glu Ala Lys Asp Ser Arg Leu Gln Asp Gln Arg
 740 745 750 755
 CAG AAC TCT CCT GCA GGG AAT AAA GAA AAT ATT AAA CCC AAT GAA ACA 2361
 Gln Asn Ser Pro Ala Gly Asn Lys Glu Asn Ile Lys Pro Asn Glu Thr
 760 765 770
 15 TCA CCT AGC TTC TCA AAA GCT GAA AAC AAA GGT ATA TCA CCA GTT GTT 2409
 Ser Pro Ser Phe Ser Lys Ala Glu Asn Lys Gly Ile Ser Pro Val Val
 775 780 785
 TCT GAA CAT AGA AAA CAG ATT GAT GAT TTA AAG AAA TTT AAG AAT GAT 2457
 Ser Glu His Arg Lys Gln Ile Asp Asp Leu Lys Lys Phe Lys Asn Asp
 20 790 795 800
 TTT AGG TTA CAG CCA AGT TCT ACT TCT GAA TCT ATG GAT CAA CTA CTA 2505
 Phe Arg Leu Gln Pro Ser Ser Thr Ser Glu Ser Met Asp Gln Leu Leu
 805 810 815
 AAC AAA AAT AGA GAG GGA GAA AAA TCA AGA GAT TTG ATC AAA GAC AAA 2553
 25 Asn Lys Asn Arg Glu Gly Glu Lys Ser Arg Asp Leu Ile Lys Asp Lys
 820 825 830 835
 ATT GAA CCA AGT GCT AAG GAT TCT TTC ATT GAA AAT AGC AGC AGC AAC 2601
 Ile Glu Pro Ser Ala Lys Asp Ser Phe Ile Glu Asn Ser Ser Ser Asn

	840	845	850	
	TGT ACC AGT GGC AGC AGC AAG CCG AAT AGC CCC AGC ATT TCC CCT TCA			2649
	Cys Thr Ser Gly Ser Ser Lys Pro Asn Ser Pro Ser Ile Ser Pro Ser			
	855	860	865	
5	ATA CTT AGT AAC ACG GAG CAC AAG AGG GGA CCT GAG GTC ACT TCC CAA			2697
	Ile Leu Ser Asn Thr Glu His Lys Arg Gly Pro Glu Val Thr Ser Gln			
	870	875	880	
	GGG GTT CAG ACT TCC AGC CCA GCA TGT AAA CAA GAG AAA GAC GAT AAG			2745
	Gly Val Gln Thr Ser Ser Pro Ala Cys Lys Gln Glu Lys Asp Asp Lys			
10	885	890	895	
	GAA GAG AAG AAA GAC GCA GCT GAG CAA GTT AGG AAA TCA ACA TTG AAT			2793
	Glu Glu Lys Lys Asp Ala Ala Glu Gln Val Arg Lys Ser Thr Leu Asn			
	900	905	910	915
	CCC AAT GCA AAG GAG TTC AAC CCA CGT TCC TTC TCT CAG CCA AAG CCT			2841
15	Pro Asn Ala Lys Glu Phe Asn Pro Arg Ser Phe Ser Gln Pro Lys Pro			
	920	925	930	
	TCT ACT ACC CCA ACT TCA CCT CGG CCT CAA GCA CAA CCT AGC CCA TCT			2889
	Ser Thr Thr Pro Thr Ser Pro Arg Pro Gln Ala Gln Pro Ser Pro Ser			
	935	940	945	
20	ATG GTG GGT CAT CAA CAG CCA ACT CCA GTT TAT ACT CAG CCT GTT TGT			2937
	Met Val Gly His Gln Gln Pro Thr Pro Val Tyr Thr Gln Pro Val Cys			
	950	955	960	
	TTT GCA CCA AAT ATG ATG TAT CCA GTC CCA GTG AGC CCA GGC GTG CAA			2985
	Phe Ala Pro Asn Met Met Tyr Pro Val Pro Val Ser Pro Gly Val Gln			
25	965	970	975	
	CCT TTA TAC CCA ATA CCT ATG ACG CCC ATG CCA GTG AAT CAA GCC AAG			3033
	Pro Leu Tyr Pro Ile Pro Met Thr Pro Met Pro Val Asn Gln Ala Lys			
	980	985	990	995

ACA TAT AGA GCA GTA CCA AAT ATG CCC CAA CAG CGG CAA GAC CAG CAT 3081
 Thr Tyr Arg Ala Val Pro Asn Met Pro Gln Gln Arg Gln Asp Gln His
 1000 1005 1010
 CAT CAG AGT GCC ATG ATG CAC CCA GCG TCA GCA GCG GGC CCA CCG ATT 3129
 5 His Gln Ser Ala Met Met His Pro Ala Ser Ala Ala Gly Pro Pro Ile
 1015 1020 1025
 GCA GCC ACC CCA CCA GCT TAC TCC ACG CAA TAT GTT GCC TAC AGT CCT 3177
 Ala Ala Thr Pro Pro Ala Tyr Ser Thr Gln Tyr Val Ala Tyr Ser Pro
 1030 1035 1040
 10 CAG CAG TTC CCA AAT CAG CCC CTT GTT CAG CAT GTG CCA CAT TAT CAG 3225
 Gln Gln Phe Pro Asn Gln Pro Leu Val Gln His Val Pro His Tyr Gln
 1045 1050 1055
 TCT CAG CAT CCT CAT GTC TAT AGT CCT GTA ATA CAG GGT AAT GCT AGA 3273
 Ser Gln His Pro His Val Tyr Ser Pro Val Ile Gln Gly Asn Ala Arg
 15 1060 1065 1070 1075
 ATG ATG GCA CCA CCA ACA CAC GCC CAG CCT GGT TTA GTA TCT TCT TCA 3321
 Met Met Ala Pro Pro Thr His Ala Gln Pro Gly Leu Val Ser Ser Ser
 1080 1085 1090
 GCA ACT CAG TAC GGG GCT CAT GAG CAG ACG CAT GCG ATG TAT GCA TGT 3369
 20 Ala Thr Gln Tyr Gly Ala His Glu Gln Thr His Ala Met Tyr Ala Cys
 1095 1100 1105
 CCC AAA TTA CCA TAC AAC AAG GAG ACA AGC CCT TCT TTC TAC TTT GCC 3417
 Pro Lys Leu Pro Tyr Asn Lys Glu Thr Ser Pro Ser Phe Tyr Phe Ala
 1110 1115 1120
 25 ATT TCC ACG GGC TCC CTT GCT CAG CAG TAT GCG CAC CCT AAC GCT ACC 3465
 Ile Ser Thr Gly Ser Leu Ala Gln Gln Tyr Ala His Pro Asn Ala Thr
 1125 1130 1135
 CTG CAC CCA CAT ACT CCA CAC CCT CAG CCT TCA GCT ACC CCC ACT GGA 3513

Leu His Pro His Thr Pro His Pro Gln Pro Ser Ala Thr Pro Thr Gly
 1140 1145 1150 1155
 CAG CAG CAA AGC CAA CAT GGT GGA AGT CAT CCT GCA CCC AGT CCT GTT 3561
 Gln Gln Gln Ser Gln His Gly Gly Ser His Pro Ala Pro Ser Pro Val
 5 1160 1165 1170
 CAG CAC CAT CAG CAC CAG GCC GCC CAG GCT CTC CAT CTG GCC AGT CCA 3609
 Gln His His Gln His Gln Ala Ala Gln Ala Leu His Leu Ala Ser Pro
 1175 1180 1185
 CAG CAG CAG TCA GCC ATT TAC CAC GCG GGG CTT GCG CCA ACT CCA CCC 3657
 Gln Gln Gln Ser Ala Ile Tyr His Ala Gly Leu Ala Pro Thr Pro Pro
 10 1190 1195 1200
 TCC ATG ACA CCT GCC TCC AAC ACG CAG TCG CCA CAG AAT AGT TTC CCA 3705
 Ser Met Thr Pro Ala Ser Asn Thr Gln Ser Pro Gln Asn Ser Phe Pro
 1205 1210 1215
 GCA GCA CAA CAG ACT GTC TTT ACG ATC CAT CCT TCT CAC GTT CAG CCG 3753
 Ala Ala Gln Gln Thr Val Phe Thr Ile His Pro Ser His Val Gln Pro
 1220 1225 1230 1235
 GCG TAT ACC AAC CCA CCC CAC ATG GCC CAC GTA CCT CAG GCT CAT GTA 3801
 Ala Tyr Thr Asn Pro Pro His Met Ala His Val Pro Gln Ala His Val
 20 1240 1245 1250
 CAG TCA GGA ATG GTT CCT TCT CAT CCA ACT GCC CAT GCG CCA ATG ATG 3849
 Gln Ser Gly Met Val Pro Ser His Pro Thr Ala His Ala Pro Met Met
 1255 1260 1265
 CTA ATG ACG ACA CAG CCA CCC GGC GGT CCC CAG GCC GCC CTC GCT CAA 3897
 Leu Met Thr Thr Gln Pro Pro Gly Gly Pro Gln Ala Ala Leu Ala Gln
 25 1270 1275 1280
 AGT GCA CTA CAG CCC ATT CCA GTC TCG ACA ACA GCG CAT TTC CCC TAT 3945
 Ser Ala Leu Gln Pro Ile Pro Val Ser Thr Thr Ala His Phe Pro Tyr

1285	1290	1295	
ATG ACG CAC CCT TCA GTA CAA GCC CAC CAC CAA CAG CAG TTG			3987
Met Thr His Pro Ser Val Gln Ala His His Gln Gln Leu			
1300	1305	1310	
TAAGGCTGCC CTGGAGGAAC CGAAAGGCCA ATTCCCTCC TCCCTCTAC TGCTTCTACC			4047
AACTGGAAAGC ACAGAAAACT AGAATTCAT TTATTTGTT TTTAAAATAT ATATGTTGAT			4107
TTCTTGTAAC ATCCAATAGG AATGCTAAC A GTTCACTTGC AGTGGAAAGAT ACTTGGACCG			4167
AGTAGAGGCA TTTAGGAAC TGGGGGCTAT TCCATAATT CATATGCTGT TTCAGAGTCC			4227
CGCAGGTACC CCAGCTCTGC TTGCCGAAAC TGGAAGTTAT TTATTTTTA ATAACCCTTG			4287
AAAGTCATGA ACACATCAGC TAGCAAAAGA AGTAACAAGA GTGATTCTTG CTGCTATTAC			4347
TGCTAAAAAA AAAAAAAA			4367

配列番号 : 2

配列の長さ : 203

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列

CA	CC	AC	CA	AC	GA	GC	AG	CA	GC	AG	CAG	CAG		60
C	A	G	C	A	G	C	A	G	C	A	G	C	G	
C	A	G	C	A	G	C	A	G	C	A	G	C	G	120
C	A	G	C	A	G	C	A	G	C	A	G	C	G	
C	A	G	C	A	G	C	A	G	C	A	G	C	G	180
C	A	G	C	A	G	C	A	G	C	A	G	C	G	
CAGCATCACG	GAAACTCTGG	GCC												203

配列番号 : 3

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列

CACCAACCAGC AACAGCAACA

20

配列番号：4

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

GGCCCAGAGT TTCCGTGATG

20

配列番号：5

配列の長さ：165

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

CAGCAGCAGC AGCAGCAGCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAGC AGCAGCAGCA GCAGCAGCAG 60

CAGCAGCAGC AGCAGCAGCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAGC AGCAGCAGCA GCAGCAGCAG 120

CAGCAGCAGC AGCAGCAGCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAGC AGCAGCAGCA GCAGCAGCAG 165

配列番号：6

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

CCCTCACCAT GTCGCTGAAG C

21

配列番号：7

配列の長さ：19

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

CGACGCTAGA AGGCCGCTG

19

配列番号：8

配列の長さ：19

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

CTTGC GGACA TTGGCAGCC

19

配列番号：9

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

TTCTCTCAGC CAAAGCCTTC TACTACC

27

配列番号：10

配列の長さ：19

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

TATCCGCAGC TCCGCTCCC

19

配列番号：11

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

AGCCGGGCCG AAACGCGCCG

20

請求の範囲

1. 配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列（ただし、第166番目ないし第188番目のGlnの繰り返し数は15～100の間で変化する）をコードする核酸領域を含む核酸断片。
- 5 2. 前記核酸領域は、配列表の配列番号1に示される塩基配列のうち、49 nt～3987 ntの領域（ただし、543 nt～612 ntにあるCAG又はCAAの繰り返し数は15～100の間で変化し、また、この領域中のCAAはCAGであってもよい）である請求項1記載の核酸断片。
- 10 3. 請求項1又は2記載の核酸断片によりコードされるアミノ酸配列を有するタンパク質。
4. 請求項3記載のタンパク質と抗原抗体反応を行う抗体。
5. 請求項1又は2記載の核酸断片から転写されるmRNAとハイブリダイズしてその翻訳を阻害する、15 bp以上のサイズを有するアンチセンス核酸。
- 15 6. 請求項1又は2記載の核酸断片を、ヒト体内で所望の遺伝子を発現させることができる発現ベクターに組込んだ、ヒト体内で前記核酸断片を発現させることができる組換えベクター。
7. 請求項6記載の組換えベクターをヒトに導入し、ヒト体内で請求項1又は2記載の核酸断片を発現させる方法。

1/6

1 TATCCGCACCTCCGCTCCCACCCGGCGCCTCGGCAGCCCCGCCCTCCGATGCCCTCAGCG
 1 F-1006 M R S A
 61 GCCGCAGCTCCTCGGAGTCCCAGGGTG GCCACCGAGTCTGCCCTCGCCAGCCAGG
 5 A A A P R S P A V A T E S R R F A A A R
 121 TGGCCCGGGTGGCGCTCGCTCCAGCGGCCGGCGGGAGCGGGGGGGGGCGGTGGC
 25 W P G W R S L Q R P A R R S G R G G G G
 181 GCGGCCCCGGGACCGTATCCCTCCGCCGCCCTCCCCCGCCGCCGCCGCCGCCCTCCC
 45 A A P G P Y P S A A P P P P G P G P P P
 241 TCCCGGCAGAGCTGCCCTCCGCCCTCAGACTGTTGGTAGCAACGGCAACGGCGC
 65 S R Q S S P P S A S D C F G S N G N G G
 301 GCGCCGTTTCGGCCCGGCTCCGGCGCTCTGGTCTCGCGGGCTCCCCGCCCTTC
 R-1002
 85 G A F R P G S R R L L G L G G G P P R P F
 361 GTCGTCGTCTCTCCCCCTGCCAGCCGGCGCCCTCCGGCCGCCAACCCGCC
 105 V V V L L P L A S P G A P P A A P T R A
 421 TCCCCGCTCGGCCTCGCGTCCCGCGCTCCGGCGTCTCTGGCGCCCTGGCGCC
 125 S P L G A R A S P P R S G V S L A R P A
 481 CCCGGCTGTCCCCGCCGGCGTGAGCCGGTGTATGGGCCCCCTCACCATGTCGCTGAAG
 F-1
 145 P G C P R P A C E P V Y G P L T M S L K
 541 CCCCCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG
 165 P Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q
 601 CAGCAGCAGCAGCCGCCGCCGCCGCCGCGCTGCCAATGTCGCAAGCCGGCGCAGCGCCT
 R-2
 185 Q Q Q Q P P P A A A N V R K P G G S G L
 661 CTAGCGTCGCCGCCGCCGCCGCCCTCGCGTCCTCGTCTCGGTCTCTCGTCCTCGGCC
 R-1
 205 L A S P A A A P S P S S S S V S S S S A
 721 ACGGCTCCCTCCTCGGTGGTCGGCGACCTCCGGGGGGAGGCCCCGGCTGGCAGA
 225 T A P S S V V A A T S G G G R P G L G R
 781 GGTCGAAACAGTAACAAAGACTGCCTCAGTCTACGATTCTTTGATGGAATCTATGCA
 245 G R N S N K G L P Q S T I S F D G I Y A
 841 AATATGAGGATGGTCATATACTTACATCAGTTGTTGGCTCCAAATGTGAAGTACAAGTG
 265 N M R M V H I L T S V V G S K C E V Q V
 901 AAAAATGGAGGTATATATGAAGGGAGTTTTAAAACCTACAGTCCGAAAGTGTGATTTGGTA
 285 K N G G I Y E G V F K T Y S P K C D L V
 961 CTTGATGCCGCACATGAGAAAAGTACAGAATCCAGTTGGGGCGAAACGTGAAGAAATA
 305 L D A A H E K S T E S S S G P K R E E I
 1021 ATGGAGAGTATTTGTTCAAATGTCAGACTTGTGTTGACAGTTAAAGATATGGAC
 325 M E S I L F K C S D F V V V Q F K D M D
 1081 TCCAGTTATGCAAAAAGAGATGCTTTACTGACTCTGCTATCAGTGCTAAAGTGAATGGC
 345 S S Y A K R D A F T D S A I S A K V N G
 1141 GAACACAAAGAGAAGGACCTGGAGCCCTGGATGCAGGTGAACCTCACAGCCAATGAGGAA
 365 E H K E K D L E P W D A G E L T A N E E
 1201 CTTGAGGCTTGAGGAAATGACGTATCTAATGGATGGATCCCAATGATATGTTGATAT
 385 L E A L E N D V S N G W D P N D M F R Y
 1261 AATGAAGAAAATTATGGTGTAGTGTCTACGTATGATAGCAGTTATCTCGTATACAGTG
 405 N E E N Y G V V S T Y D S S L S S Y T V

2/6

1321 CCCTTAGAAAGAGATAACTCAGAAGAATTTAAAACGGGAAGCAAGGGAAACCAGTTA
 425 P L E R D N S E E F L K R E A R A N Q L
 1381 GCAGAAGAAATTGAGTCAGTGCCTAGTACAAAGCTCGAGTGGCCCTGGAAAACGATGAT
 445 A E E I E S S A Q Y K A R V A L E N D D
 1441 AGGAGTGAGGAAGAAAAATACACAGCAGTTCAAGAGAAATTCCAGTGAACGTGAGGGCAC
 465 R S E E E K Y T A V Q R N S S E R E G H
 1501 AGCATAAACACTAGGGAAAATAAATATATTCTCCTGGACAAAGAAATAGAGAAGTCATA
 485 S I N T R E N K Y I P P G Q R N R E V I
 1561 TCCTGGGAAGTGGGAGACAGAATTCAACCGCTATGGGCCAGGCCATGGATGGCTCCATG
 505 S W G S G R Q N S P R M G Q P G S G S M
 1621 CCATCAAGATCCACTTCTCACACTTCAGATTCAACCCGAATTCTGGTCAGACCAAAGA
 525 P S R S T S H T S D F N P N S G S D Q R
 1681 GTAGTTAACGGGTGTTCCCTGGCCATCGCCTGCCATCTCCTCCTCGCCCCACCT
 545 V V N G G V P W P S P C P S P S S R P P
 1741 TCTCGCTACCAGTCAGGCCCCAACTCTTCCACCTCGGGCAGCCACCCCTACACGGCG
 565 S R Y Q S G P N S L P P R A A T P T R P
 1801 CCCTCCAGGCCCTCGGGCCATCCAGACCCCCGTCACCCCTCTGCTCATGGTCT
 585 P S R P P S R P S R P P S H P S A H G S
 1861 CCAGCTCCTGCTCTACTATGCCTAACGCATGCTTCAGAAGGGCTCCAAGGATGTCC
 605 P A P V S T M P K R M S S E G P P R M S
 1921 CCAAAGGCCAGCGACATCCTCGAAATCACAGAGTTCTGCTGGGAGGGGTTCCATATCC
 625 P K A Q R H P R N H R V S A G R G S I S
 1981 AGTGGCCTAGAATTGTATCCCACAACCCACCCAGTGAAGCAGCTACTCCTCCAGTAGCA
 645 S G L E F V S H N P P S E A A T P P V A
 2041 AGGACCAAGTCCCTGGGGGAACTGGTCATCAGTGGTCAGTGGGTTCCAAGATTATCC
 665 R T S P S G G T W S S V V S G V P R L S
 2101 CCTAAAACATAGACCCAGGTCTCCAGACAGAACAGTATTGAAATACCCAGTGGG
 685 P K T H R P R S P R Q N S I G N T P S G
 2161 CCAGTTCTGCTCTCCCCAAGCTGGTATTATTCCAACCTGAAGCTGTTGCCATGCCATT
 705 P V L A S P Q A G I I P T E A V A M P I
 2221 CCAGCTGCATCTCCTACGCCCTGCTAGCTGCATGAACAGAGCTGTTACCCCTCTAGT
 725 P A A S P T P A S P A S N R A V T P S S
 2281 GAGGCTAAAGATTCCAGGCTCAAGATCAGAGGAGAACTCTCTGCAGGGAAATAAGAA
 745 E A K D S R L Q D Q R Q N S P A G N K E
 2341 AATATTAAACCCAATGAAACATCACCTAGCTTCTCAAAGCTGAAAACAAAGGTATATCA
 765 N I K P N E T S P S F S K A E N K G I S
 2401 CCAGTTGTTCTGAACATAGAAAACAGATTGATGATTAAAGAAATTAAAGAATGATT
 785 P V V S E H R K Q I D D L K K F K N D F
 2461 AGGTTACAGCCAAGTTCTACTTCTGAATCTATGGATCAACTACTAAACAAAAATAGAGAG
 805 R L Q P S S T S E S M D Q L L N K N R E
 2521 GGAGAAAATCAAGAGATTGATCAAAGACAAAATTGAACCAAGTGTCAAGGATTCTTC
 825 G E K S R D L I K D K I E P S A K D S F
 2581 ATTGAAAATAGCAGCAGCAACTGTACCTAGTGGCAGCAGCAAGCCGAATAGCCCCAGCATT
 845 I E N S S S N C T S G S S K P N S P S I

3/6

2641 TCCCCTTCAATACTTAGTAACACGGAGCACAAAGAGGGGACCTGAGGTCACTTCCCAAGGG
 865 S P S I L S N T E H K R G P E V T S Q G
 2701 GTTCAGACTTCCAGCCCAGCATGTAAACAAGAGAAAGACGATAAGGAAGAGAAGAAAGAC
 885 V Q T S S P A C K Q E K D D K E E K K D
 2761 GCAGCTGAGCAAGTTAGGAAATCAACATTGAATCCCAATGCAAAGGAGTTCAACCCACGT
 905 A A E Q V R K S T L N P N A K E F N P R
 2821 TCCCTCTCTCAGCCAAAGCCTCTACTACCCCCACTTCACCTGGCCTCAAGCACAAAC
F-13
 925 S F S Q P K P S T T P T S P R P Q A Q P
 2881 AGCCCACATCTATGGTGGGTCAACAGCCAACCTCCAGTTATACTCAGCCTGTTGTTT
 945 S P S M V G H Q Q P T P V Y T Q P V C F
 2941 GCACCAAATATGATGTATCCAGTCCCAGTGAGGCCAGCGTGCACCTTATACCCAATA
 965 A P N M M Y P V P V S P G V Q P L Y P I
 3001 CCTATGACGCCATGCCAGTGAATCAAGCCAAGACATATAGACACTACCAAATATGCC
 985 P M T P M P V N Q A K T Y R A V P N M P
 3061 CAACAGCGGCAAGACCAGCATCATCAGAGTGCATGACCCAGCGTCAGCAGCGGC
 1005 Q Q R Q D Q H H Q S A M M H P A S A A G
 3121 CCACCGATTGCAGCCACCCACCAGCTTACTCCACGCAATATGTTGCCTACAGTCCTCAG
 1025 P P I A A T P P A Y S T Q Y V A Y S P Q
 3181 CAGTTCCCAAATCAGCCCCCTGTTCAAGCATGTGCCACATTATCAGTCTCAGCATCCTCAT
 1045 Q F P N Q P L V Q H V P H Y Q S Q H P H
 3241 GTCTATAGTCCTGTAATACAGGTAAATGCTAGAATGATGGCACCAACACAGGCCAG
 1065 V Y S P V I Q G N A R M M A P P T H A Q
 3301 CCTGGTTTAGTATCTCTCAGCAACTCAGTACGGGCTCATGACCAGACGCATGCGATG
 1085 P G L V S S S A T Q Y G A H E Q T H A M
 3361 TATGCATGTCCCAAATTACCATACAAACAAGGAGACAAGCCCTCTTCTACTTIGCATT
 1105 Y A C P K L P Y N K E T S P S F Y F A I
 3421 TCCACGGGCTCCCTTGCTCAGCAGTATGCGCACCTAACGCTACCCCTGCACCCACATACT
 1125 S T G S L A Q Q Y A H P N A T L H P H T
 3481 CCACACCCCTCAGCCTCAGCTACCCCCACTGGACAGCAGCAAAGCCAACATGGTGGAAAGT
 1145 P H P Q P S A T P T G Q Q Q S Q H G G S
 3541 CATCCTGCACCCAGTCCTGTTCAAGCAGTATGCCACCATCAGCACCCAGGCCAGGCTCTCCATCTG
 1165 H P A P S P V Q H H Q H Q A A Q A L H L
 3601 GCCAGTCCACAGCAGCAGTCAGCCATTACACGGGGCTTGCACCAACTCCACCCCTCC
 1185 A S P Q Q Q S A I Y H A G L A P T P P S
 3661 ATGACACCTGCCTCCAACACGCAGTCGCCACAGAATAGTTCCACAGCACAACAGACT
 1205 M T P A S N T Q S P Q N S F P A A Q Q T
 3721 GTCTTACGATCCATCTCTCACGTTCAAGCGCGTATACCAACCCACCCACATGGCC
 1225 V F T I H P S H V Q P A Y T N P P H M A
 3781 CACGTACCTCAGGCTCATGTACAGTCAGGAATGGTCCCTCTCATCCAACATGCCATGCG
 1245 H V P Q A H V Q S G M V P S H P T A H A
 3841 CCAATGATGCTAATGACGACACAGCCACCCGGCGTCCCCAGGCCCTCGCTCAAAGT
 1265 P M M L M T T Q P P G G B Q A A L A Q S
 3901 GCACTACAGCCCATTCCAGTCTCGACAAACAGCGCATTCCCTATATGACGCACCCCTCA
 1285 A L Q P I P V S T T A H F P Y M T H P S
 3961 GTACAAGCCCACCAACACAGCAGTTGTAAGGCTGCCCTGGAGGAACCGAAAGGCCAAAT
 1305 V Q A H H Q Q Q L *

4 / 6

4021 TCCCTCCTCCCTTCACTGCTTCTACCAACTGGAAGCACAGAAAATAGAATTTCATTAA
 4081 TTTTGTCCCCAAATATATATGTTGATTTCTTGTAAACATCCAATAGGAATGCTAACAGTT
 4141 CACTTGCACTGGAAGATACTTGGACCGAGTAGAGGCATTAGGAACTTGGGGCTATTCC
 4201 ATAATTCCATATGCTGTTTCAGAGTCCCGCAGGTACCCAGCTCTGCTTGCCGAAACTGG
 4261 AAGTTATTTATTTTTAATAACCCCTTGAAAGTCATGAACACATCAGCTAGCAAAAGAAGT
 4321 AACAAAGAGTGATTCTTGCTGCTATTACTGCT(A)_n

図 4

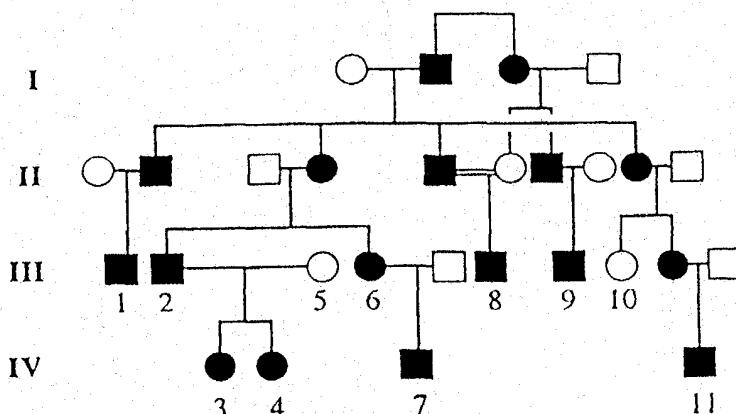
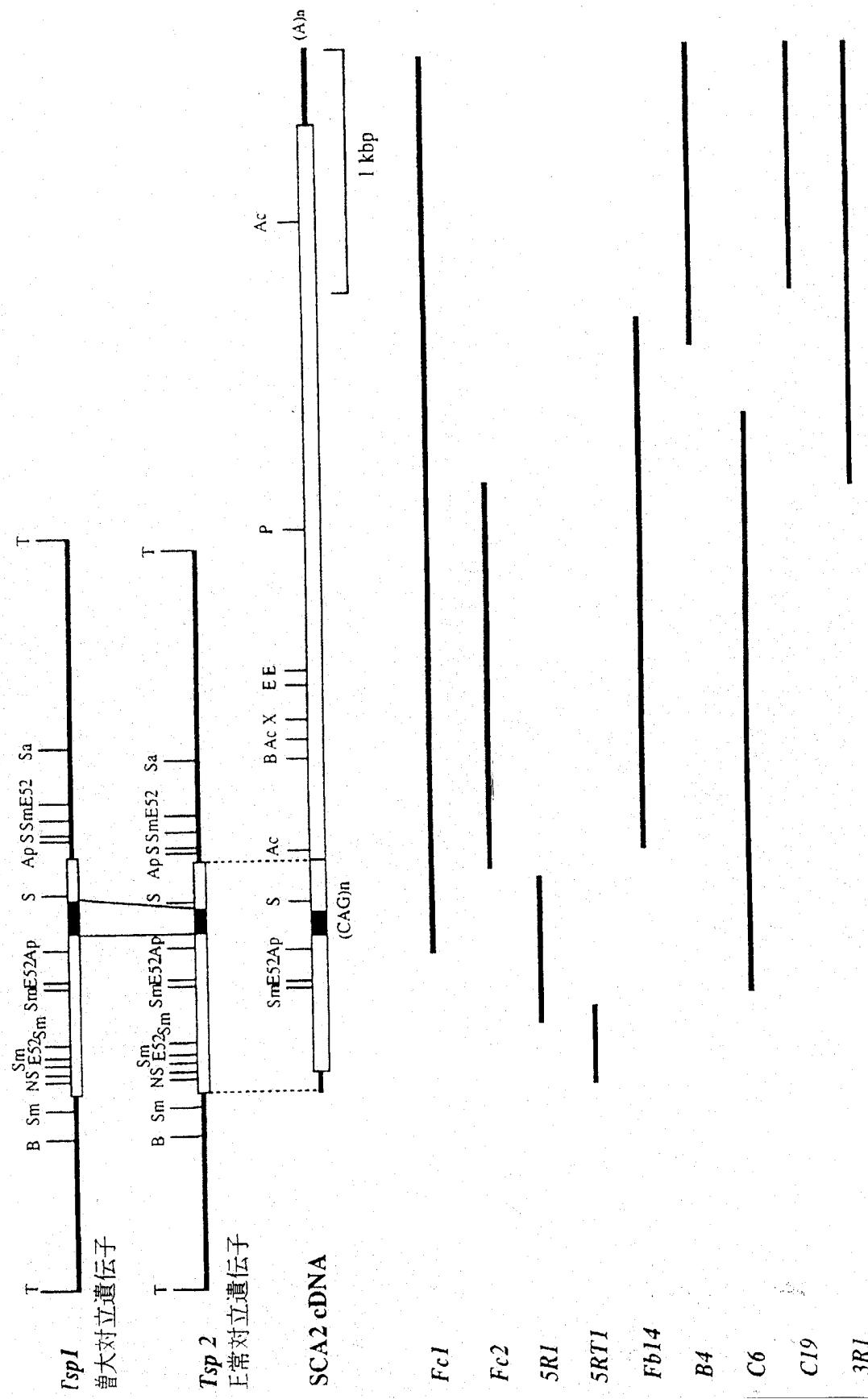


図 5

5 / 6



6/6

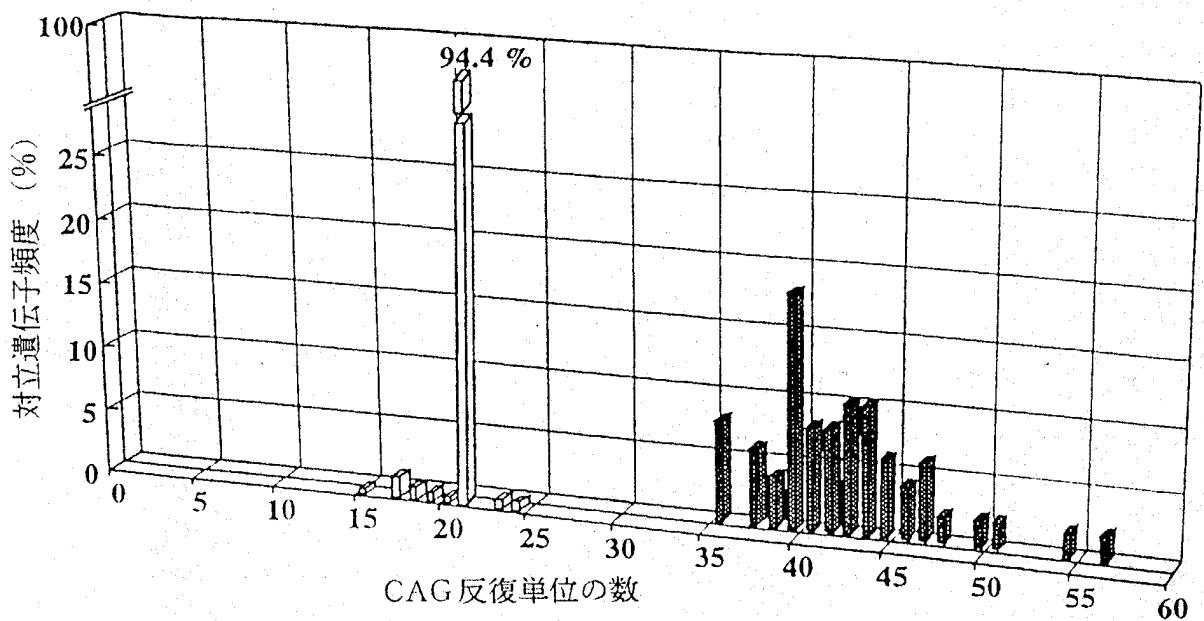


図7

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP97/03946

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. C14 C12N15/12, C12P21/02, C12Q1/68, C07K16/18

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. C14 C12N15/12, C12P21/02, C12Q1/68, C07K16/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), Genbank (GENETYX)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	Sanpai, K. et al. "Identification of the spinocerebellar ataxia type 2 gene using a direct identification of repeat expansion and cloning technique, DIRECT" Nat. Genet. (1996, Nov.) 第14巻 第3号 p. 277-284	1-7
PX	Plust, S-M. et al. "Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2" Nat. Genet. (1996, Nov.) 第14巻 第3号 p. 269-276	1-7
PA	Imbert, G. et al. "Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamine repeats" Nat. Genet. (1996, Nov.) 第14巻 第3号 p. 285-2	1-7

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「I」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願目前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16. 01. 98

国際調査報告の発送日

27.01.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

平田 和男

4 B 9549

印

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP97/03946

C(続き)、 引用文献の カテゴリー*	関連すると認められる文献 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	91 Yvon, T. et al. "Polygutamine expansion as a pathological epitope in huntington's disease and four dominant cerebellar ataxias" Nature (1995) 第378巻 p. 403-406	1-7
A	Koide, R. et al. "Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy(DRPLA)" Nat. Genet. (1994) 第6巻 p. 9-13	1-7
A	Li, S-H. et al. "Novel Triplet Repeat Containing Genes in Human Brain: Cloning, Expression, and Length Polymorphisms" Genomics (1993) 第16巻 第3号 p. 572-579	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03946

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12N15/12, C12P21/02, C12Q1/68, C07K16/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12N15/12, C12P21/02, C12Q1/68, C07K16/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), Genbank (GENETYX)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Sanpai, K. et al. "Identification of the spinocerebellar ataxia type 2 gene using a direct identification of repeat expansion and cloning technique, DIRECT" Nat. Genet. (1996, Nov.), Vol. 14, No. 3, p. 277-284	1 - 7
PX	Plust, S-M. et al. "Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2" Nat. Genet. (1996, Nov.), Vol. 14, No. 3, p. 269-276	1 - 7
PA	Imbert, G. et al. "Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamine repeats" Nat. Genet. (1996, Nov.), Vol. 14, No. 3, p. 285-291	1 - 7
A	Yvon, T. et al. "Polyglutamine expansion as a pathological epitope in huntington's disease and four dominant cerebellar ataxias" Nature (1995), Vol. 378, p. 403-406	1 - 7

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search January 16, 1998 (16. 01. 98)	Date of mailing of the international search report January 27, 1998 (27. 01. 98)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03946

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Koide, R. et al. "Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA)" Nat. Genet. (1994), Vol. 6, p. 9-13	1 - 7
A	Li, S-H. et al. "Novel Triplet Repeat Containing Genes in Human Brain: Cloning, Expression, and Length Polymorphisms" Genomics (1993), Vol. 16, No. 3, p. 572-579	1 - 7

E P

US

P C T

特許協力条約

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 97PF164 の書類記号 — PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。		
国際出願番号 PCT/JP97/03946	国際出願日 (日、月、年)	30. 10. 97	優先日 (日、月、年)
出願人(氏名又は名称) 株式会社エスアールエル			

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。
2. 発明の單一性が欠如している(第II欄参照)。
3. この国際出願は、ヌクレオチド及び／又はアミノ酸配列リストを含んでおり、次の配列リストに基づき国際調査を行った。
 - この国際出願と共に提出されたもの
 - 出願人がこの国際出願とは別に提出したもの
 - しかし、且つ時の国際出願の開示の範囲を越える事項を含まない旨を記載した書面が添付されていない
 - この国際調査機関が書換えたもの
4. 発明の名称は 出願人が提出したものと承認する。
 - 次に示すように国際調査機関が作成した。
5. 要約は 出願人が提出したものと承認する。
 - 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1ヶ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。
6. 要約書とともに公表される図は、
第 _____ 図とする。 出願人が示したとおりである。 なし
 - 出願人は図を示さなかった。
 - 本図は発明の特徴を一層よく表している。

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP97/03946

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. C1° C12N15/12, C12P21/02, C12Q1/68, C07K16/18

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. C1° C12N15/12, C12P21/02, C12Q1/68, C07K16/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), Genbank (GENETYX)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	Sanpai, K. et al. "Identification of the spinocerebellar ataxia type 2 gene using a direct identification of repeat expansion and cloning technique, DIRECT" Nat. Genet. (1996, Nov.) 第14巻 第3号 p. 277-284	1-7
PX	Plust, S-M. et al. "Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2" Nat. Genet. (1996, Nov.) 第14巻 第3号 p. 269-276	1-7
PA	Imbert, G. et al. "Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamine repeats" Nat. Genet. (1996, Nov.) 第14巻 第3号 p. 285-2	1-7

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16. 01. 98

国際調査報告の発送日

27.01.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許序審査官(権限のある職員)

平田 和男

4 B 9549



電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C(続き) 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	91 Yvon, T. et al. "Polyglutamine expansion as a pathological epitope in huntington's disease and four dominant cerebellar ataxias" Nature (1995) 第378巻 p. 403-406	1-7
A	Koide, R. et al. "Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA)" Nat. Genet. (1994) 第6巻 p. 9-13	1-7
A	Li, S-H. et al. "Novel Triplet Repeat Containing Genes in Human Brain: Cloning, Expression, and Length Polymorphisms" Genomics (1993) 第16巻 第3号 p. 572-579	1-7